

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

✓ Select All

✗ Clear Selections

Print/Save Selected

Send Results

Display Selected

Format

Free

1. ☐ 2/5/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

015784337

WPI Acc No: 2003-846540/200379

XRAM Acc No: C03-238080

New alkaline protease having specific amino acid residue at a specific position of its amino acid sequence, useful for producing detergent compositions, laundry detergent, fiber modifiers, leather-treating agents or pipe cleaners

Patent Assignee: KAO CORP (KAOS)

Inventor: IZAWA Y; KOBAYASHI T; NOMURA M; OKUDA M; SAEKI K; SAITO K; SATO T; SUMITOMO N

Number of Countries: 034 Number of Patents: 005

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 1347044	A2	20030924	EP 20036472	A	20030321	200379 B
US 20040002432	A1	20040101	US 2003385662	A	20030312	200402
CN 1446910	A	20031008	CN 2003107456	A	20030321	200403
→ JP 2004000122	A	20040108	JP 2002304230	A	20021018	200405
JP 2004057195	A	20040226	JP 2002304231	A	20021018	200416

Priority Applications (No Type Date): JP 2002304231 A 20021018; JP 200281428 A 20020322; JP 2002165987 A 20020606; JP 2002304230 A 20021018

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

EP 1347044 A2 E 31 C12N-009/16

Designated States (Regional): AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI SK TR

US 20040002432 A1 C11D-003/386

CN 1446910 A C12N-009/50

JP 2004000122 A 29 C12N-015/09

JP 2004057195 A 29 C12N-015/09

Abstract (Basic): EP 1347044 A2

NOVELTY - An alkaline protease having a fully defined sequence of 434 amino acids (I) given in the specification, or an amino acid sequence at least 80% homology with (I), where an amino acid residue at position 65, 101, 163, 170, 171, 273, 320, 359 or 387 of (I) is selected from 16 amino acid residues, is new.

DETAILED DESCRIPTION - An alkaline protease having a fully defined sequence of 434 amino acids (I) given in the specification, or an amino acid sequence at least 80% homology with (I), where an amino acid residue at position 65, 101, 163, 170, 171, 273, 320, 359 or 387 of (I) is selected from 16 amino acid residues, is new.

The amino acid residues at the corresponding positions are selected from:

- (a) position 65: proline;
- (b) position 101: asparagines;
- (c) position 163: histidine, aspartic acid, phenylalanine, lysine, asparagine, serine, isoleucine, leucine, glutamine, threonine or valine;
- (d) position 170: valine or leucine;
- (e) position 171: alanine, glutamic acid, glycine or threonine;
- (f) position 273: isoleucine, glycine or threonine;
- (g) position 320: phenylalanine, valine, threonine, leucine, isoleucine or glycine;
- (h) position 359: serine, leucine, valine, isoleucine or glutamic

acid; and

(i) position 387: alanine, lysine, glutamine, glutamic acid, arginine or histidine.

INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

- (1) a gene encoding the alkaline protease;
- (2) a recombinant vector comprising the gene of (2);
- (3) a transformant comprising the vector;
- (4) a detergent composition comprising the alkaline protease; and
- (5) production of an alkaline protease.

USE - The alkaline protease is useful for the production of a detergent composition, such as laundry detergent, fiber modifiers, leather-treating agents, cosmetic compositions, bath additives, food modifiers and pharmaceutical compositions (claimed). The alkaline protease may also be used as bleaching detergent, hard surface cleansing detergent, pipe cleaner, artificial tooth cleaner, and as a sterilizing cleanser for medical tools.

ADVANTAGE - The new alkaline protease has a more potent proteolytic capacity, exhibiting excellent detergency for the removal of a complex stain, and has high secretion capacity.

pp: 31 DwgNo 0/1

Title Terms: NEW; ALKALINE; PROTEASE; SPECIFIC; AMINO; ACID; RESIDUE;
SPECIFIC; POSITION; AMINO; ACID; SEQUENCE; USEFUL; PRODUCE; DETERGENT;
COMPOSITION; LAUNDER; DETERGENT; MODIFIED; LEATHER; TREAT; AGENT; PIPE;
CLEAN

Derwent Class: B04; D13; D16; D18; D21; D25; F06

International Patent Class (Main): C11D-003/386; C12N-009/16; C12N-009/50;
C12N-015/09

International Patent Class (Additional): C07H-021/04; C12N-001/15;

C12N-001/19; C12N-001/21; C12N-005/10; C12N-009/54; C12N-009/56;

C12N-015/57; C12N-015/63; C12N-015/74; C12P-021/02

File Segment: CPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2004 Thomson Derwent. All rights reserved.

✓ Select All

✗ Clear Selections

Print/Save Selected

Send Results

Display Selected

Format

Free

© 2004 Dialog, a Thomson business

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-122

(P2004-122A)

(43) 公開日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 1 D 3/386	C 1 1 D 3/386	4 B O 5 0
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H O O 3
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-304230 (P2002-304230)	(71) 出願人	000000918
(22) 出願日	平成14年10月18日 (2002.10.18)		花王株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2002-81428 (P2002-81428)		東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1
(32) 優先日	平成14年3月22日 (2002.3.22)		〇号
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	110000084
			特許業務法人アルガ特許事務所
		(72) 発明者	奥田 光英
			栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株
			式会社研究所内
		(72) 発明者	佐藤 剛
			栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株
			式会社研究所内
		(72) 発明者	伊澤 啓文
			栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株
			式会社研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルカリプロテアーゼ

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】複合汚れに対しても優れた洗浄性を有すると共に、分泌能の高いアルカリプロテアーゼを提供する。

【解決手段】特定のアミノ酸配列の(a)65位、(b)101位、(c)273位、(d)320位、(e)359位、(f)387位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基が下記アミノ酸残基；(a)位置：プロリン、(b)位置：アスパラギン、(c)位置：イソロイシン、グリシン、スレオニン、(d)位置：フェニルアラニン、バリン、スレオニン、ロイシン、イソロイシン、グリシン、(e)位置：セリン、ロイシン、バリン、イソロイシン、グルタミン、(f)位置：アラニン、リジン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、から選ばれたものであるアルカリプロテアーゼ。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 の (a) 65 位、(b) 101 位、(c) 273 位、(d) 320 位、(e) 359 位、(f) 387 位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基が下記アミノ酸残基；

(a) 位置：プロリン、

(b) 位置：アスパラギン、

(c) 位置：イソロイシン、グリシン、スレオニン、

(d) 位置：フェニルアラニン、バリン、スレオニン、ロイシン、イソロイシン、グリシン、

(e) 位置：セリン、ロイシン、バリン、イソロイシン、グルタミン、

(f) 位置：アラニン、リジン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、から選ばれたものであるアルカリプロテアーゼ。

10

【請求項 2】

配列番号 1 に示すアミノ酸配列又はこれと 80 % 以上の相同性をもつアミノ酸配列を有するアルカリプロテアーゼにおいて、配列番号 1 の (a) 65 位、(b) 101 位、(c) 273 位、(d) 320 位、(e) 359 位、(f) 387 位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基が下記アミノ酸残基；

(a) 位置：プロリン、

(b) 位置：アスパラギン、

(c) 位置：イソロイシン、グリシン、スレオニン、

(d) 位置：フェニルアラニン、バリン、スレオニン、ロイシン、イソロイシン、グリシン、

20

(e) 位置：セリン、ロイシン、バリン、イソロイシン、グルタミン、

(f) 位置：アラニン、リジン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、から選ばれたものであるアルカリプロテアーゼ。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載のアルカリプロテアーゼをコードする遺伝子。

【請求項 4】

請求項 3 記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

30

【請求項 5】

請求項 4 記載のベクターを含有する形質転換体。

【請求項 6】

宿主が微生物である請求項 5 記載の形質転換体。

【請求項 7】

請求項 1 又は 2 記載のアルカリプロテアーゼを含有する洗浄剤組成物。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は洗浄剤配合酵素として有用なアルカリプロテアーゼ及びそれをコードする遺伝子に関する。

40

【0002】**【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】**

産業分野でのプロテアーゼ利用の歴史は古く、衣料用洗剤をはじめとする洗浄剤から繊維の改質剤、皮革処理剤、化粧品、浴剤、食品改質剤或いは医薬品としての利用まで非常に多岐にわたっている。中でも最も工業的に大量に生産されているものが洗剤用プロテアーゼであり、例えば、アルカラーゼ（登録商標；ノボザイムズ社）、サビナーゼ（登録商標；ノボザイムズ社）、マクサカル（登録商標；ジェネンコア社）、ブラップ（登録商標；ヘンケル社）、及びプロテアーゼ K（花王）等が知られている。

【0003】

洗剤中にプロテアーゼを配合する目的は、衣料に付着した蛋白質を主成分とする汚れを分

50

解して低分子化し、界面活性剤による可溶化を促進することであるが、実際の汚れは蛋白質だけでなく皮脂由来の脂質や固体粒子等、有機物と無機物が入り混じった複数の成分を内包する複合汚れであり、このような複合汚れに対する洗浄性の高い洗浄剤が望まれていた。

【0004】

かかる観点から本発明者らは、高濃度の脂肪酸存在下でも十分なカゼイン分解活性を保持し、蛋白質だけでなく皮脂等の混在する複合汚れに対しても優れた洗浄性を有する分子量約43,000のアルカリプロテアーゼを数種見出し、先に特許出願した（特許文献1参照）。斯かるアルカリプロテアーゼ群は、その分子量、一次構造、酵素学的性質、特に非常に強い酸化剤耐性を有する点で、従来から知られているバチルス属細菌由来のセリンプロテアーゼであるズブチリシンとは異なり、新しいズブチリシンサブファミリーに分類することが提唱されている（非特許文献1参照）。

10

【0005】

しかしながら、このようなプロテアーゼであっても、工業的レベルでの生産を考えた場合、その生産量は十分な量とは言えず、培地中に効率良く分泌されるアルカリプロテアーゼが求められていた。

【0006】

一方、目的のタンパク質（酵素）を多量に分泌させる試みとしては、宿主菌（生産菌）の変異育種による改良、酵素をコードする遺伝子あるいはその制御を行う遺伝子を改変して分泌量を高める方法が知られているが、ズブチリシンについては酵素の分泌量を高めるような改変の例は見当たらない。

20

【0007】

従って、本発明は複合汚れに対しても優れた洗浄性を有すると共に、分泌能の高いアルカリプロテアーゼを提供することを目的とする。

【0008】

【特許文献1】

国際公開第99/18218号パンフレット

【非特許文献1】

Saeikiら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 279, (2000), 313-319

30

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記アルカリプロテアーゼの特性を保持しつつ、効率良く培地中に分泌できる新たな酵素の探索を行ったところ、ある種のアルカリプロテアーゼにおいて、当該アミノ酸配列中の特定位置に特定のアミノ酸残基が必要であることを見出した。

【0010】

すなわち、配列番号1の（a）65位、（b）101位、（c）273位、（d）320位、（e）359位、（f）387位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基が下記アミノ酸残基；

40

（a）位置：プロリン、

（b）位置：アスパラギン、

（c）位置：イソロイシン、グリシン、スレオニン、

（d）位置：フェニルアラニン、バリン、スレオニン、ロイシン、イソロイシン、グリシン、

（e）位置：セリン、ロイシン、バリン、イソロイシン、グルタミン、

（f）位置：アラニン、リジン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、から選ばれたものであるアルカリプロテアーゼ、及びそれをコードする遺伝子を提供するものである。

【0011】

また本発明は、該遺伝子を含有するベクター、該ベクターを含有する形質転換体を提供す

50

るものである。

【0012】

また本発明は、該アルカリプロテアーゼを含有する洗浄剤組成物を提供するものである。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明のアルカリプロテアーゼは、上記のように、配列番号1の(a) 65位、(b) 101位、(c) 273位、(d) 320位、(e) 359位、(f) 387位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基が下記アミノ酸残基；

(a) 位置：プロリン、(b) 位置：アスパラギン、(c) 位置：イソロイシン、グリシン、スレオニン、(d) 位置：フェニルアラニン、バリン、スレオニン、ロイシン、イソロイシン、グリシン、(e) 位置：セリン、ロイシン、バリン、イソロイシン、グルタミン、(f) 位置：アラニン、リジン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、から選ばれたものである。

【0014】

すなわち、本発明のアルカリプロテアーゼは、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するアルカリプロテアーゼにおける前記(a)～(f)から選ばれる位置のアミノ酸残基又は他種アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列の当該位置に相当する位置のアミノ酸残基が特定のアミノ酸残基であるプロテアーゼを意味し、これらは野生型、野生型の変異体或いは人為的に変異を施した変異体であってもよい。

【0015】

ここで、「他種アルカリプロテアーゼ」としては、野生型又は野生型の変異体であってもよく、酸化剤耐性を有し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)法による分子量が43,000±2,000であることが好ましく、配列番号1に示すアミノ酸配列と80%以上の相同性をもつアミノ酸配列を有するものが挙げられる。特に好ましくは、配列番号1に示すアミノ酸配列と80%以上の相同性をもつアミノ酸配列を有し、pH8以上のアルカリ性領域で作用する、酸化剤耐性を有する、50℃、pH10で10分間処理したとき80%以上の残存活性を示す、ジイソプロピルフルオルリン酸(DFP)及びフェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF)で阻害され、SDS-PAGEによる分子量が43,000±2,000である酵素が挙げられる。ここで、酸化剤耐性を有するとは、当該アルカリプロテアーゼを50mM過酸化水素、5mM塩化カルシウムを含む20mMブリットンロビンソン緩衝液(pH10)中で、30℃、20分間の放置後の残存活性が少なくとも50%以上を保持していることをいう。

【0016】

ここで、「配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するアルカリプロテアーゼ」としては、KP43[バチルス エスピーKSM-KP43(FERM BP-6532)由来、WO99/18218]が挙げられ、「配列番号1に示すアミノ酸配列と80%以上の相同性をもつアミノ酸配列を有するアルカリプロテアーゼ」としては、例えばプロテアーゼKP9860[バチルスエスピーKSM-KP9860(FERMBP-6534)由来、WO99/18218、GenBank Accession No. AB046403]、プロテアーゼE-1[バチルスNo. D-6(FERMP-1592)由来、特開昭49-71191、GenBank Accession No. AB046402]、プロテアーゼYa[バチルスエスピーY(FERMBP-1029)由来、特開昭61-280268、GenBank Accession No. AB046404]、プロテアーゼSD521[バチルスSD521(FERMP-11162)由来、特開平3-191781、GenBank Accession No. AB046405]、プロテアーゼA-1[NCIB12289由来、WO88/01293、GenBank Accession No. AB046406]、プロテアーゼA-2[NCIB12513由来、WO98/56927]や、配列番号1のアミノ酸配列の46位をロイシンに置換した変異体、57位をアラニンに置換した変異体、103位をアルギニンに置換した変異体、107位をリジンに置換した変異体、124位をそれぞれリジン及びアラニンに

10

20

30

40

50

置換した変異体、136位をアラニンに置換した変異体、193位をアラニンに置換した変異体、195位をそれぞれアスパラギン、グルタミン酸、アルギニン、プロリン、スレオニン、バリン、ヒスチジン、セリン、リジン、グルタミン、メチオニン、システイン、アラニン、アスパラギン酸、トリプトファン、グリシン及びフェニルアラニンに置換した変異体、247位をそれぞれスレオニン及びアルギニンに置換した変異体、257位をバリンに置換した変異体、342位をアラニンに置換した変異体、66位をアスパラギン酸に置換し且つ264位をセリンに置換した二重変異体（特願平12-355166号）、配列番号1のアミノ酸配列の84位をアルギニンに置換した変異体、104位をプロリンに置換した変異体、256位をそれぞれアラニン及びセリンに置換した変異体、369位をアスパラギンに置換した変異体（特願平13-114048号）、配列番号1のアミノ酸配列の251位をそれぞれアスパラギン、スレオニン、イソロイシン、バリン、ロイシン及びグルタミンに置換した変異体、256位をそれぞれセリン、グルタミン、アスパラギン、バリン及びアラニンに置換した変異体（特願平13-329472号）又はこれらとアミノ酸配列において80%以上、好ましくは87%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上の相同性を有するアルカリプロテアーゼが挙げられる。なお、アミノ酸配列の相同性は、リップマン-パーソン（Lipman-Pearson）法（Science, 227, 1435, 1985）によって計算される。

10

【0017】

また、「相当する位置のアミノ酸残基」を特定する方法としては、例えばリップマン-パーソン法等の公知のアルゴリズムを用いてアミノ酸配列を比較し、各アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列中に存在する保存アミノ酸残基に最大の相同性を与えることにより行うことができる。プロテアーゼのアミノ酸配列をこのような方法で整列させることにより、アミノ酸配列中にある挿入、欠失にかかわらず、相同アミノ酸残基の各プロテアーゼにおける配列中の位置を決めることが可能である。相同位置は、三次元構造中で同位置に存在すると考えられ、対象のプロテアーゼの特異的機能に関して類似した効果を有することが推定できる。

20

【0018】

すなわち、上記方法でアミノ酸配列を整列させた図1より、(a)配列番号1の65位のアミノ酸残基はスレオニン残基であるが、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼKP9860においては65位のスレオニン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基はプロリン残基であるのが好ましい。

30

【0019】

(b)配列番号1の101位のアミノ酸残基はグリシン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼE-1においては100位のセリン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基はアスパラギン残基であるのが好ましい。

【0020】

(c)配列番号1の273位のアミノ酸残基はバリン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼA-2においては272位のバリン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基は、イソロイシン、グリシン、スレオニン残基であるのが好ましく、イソロイシン残基であるのが特に好ましい。

40

【0021】

(d)配列番号1の320位のアミノ酸残基はチロシン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼSD-521においては319位のチロシン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基は、フェニルアラニン、バリン、スレオニン、ロイシン、イソロイシン、グリシン残基であるのが好ましく、フェニルアラニン残基であるのが特に好ましい。

【0022】

50

(e) 配列番号1の359位のアミノ酸残基はスレオニン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼYaにおいては358位のスレオニン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基は、セリン、ロイシン、バリン、イソロイシン、グルタミン残基であるのが好ましく、セリン残基であるのが特に好ましい。

【0023】

(f) 配列番号1の387位のアミノ酸残基はセリン残基であるが、ここで、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えばプロテアーゼSD-521においては386位のチロシン残基というように特定することができる。当該アミノ酸残基は、アラニン、リジン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン残基であるのが好ましく、アラニン残基であるのが特に好ましい。

【0024】

プロテアーゼKP43のアミノ酸配列（配列番号1）の（a）65位、（b）101位、（c）273位、（d）320位、（e）359位、（f）387位に相当する位置及びアミノ酸残基の具体例を、上記「他種アルカリプロテアーゼ」のうちの好適に用いられるもので示す（表1）。

【0025】

【表1】

位置	プロテアーゼ						
	KP43	KP9860	E-1	Ya	SD-521	A-1	A-2
(a)	65Thr	65Thr	65Pro	65Pro	65Pro	65Pro	65Pro
(b)	101Gly	101Ser	100Ser	100Ser	100Ser	101Asn	100Gly
(c)	273Val	273Val	272Ile	272Ile	272Ile	273Ile	272Val
(d)	320Tyr	320Tyr	319Tyr	319Tyr	319Tyr	320Phe	319Phe
(e)	359Thr	359Thr	358Thr	358Thr	358Thr	359Ser	358Thr
(f)	387Ser	387Ala	386Tyr	386Tyr	386Tyr	387Ala	386Ala

【0026】

また、本発明アルカリプロテアーゼにおけるアミノ酸残基の（a）～（f）の選択は、酵素活性及び酵素特性が変化しない限り2個所以上が同時になされていてよい。2箇所以上が同時になされた場合の好ましい具体例を以下に示す。尚、アミノ酸は3文字表記とし、「+」は1箇所の置換に対し付加された置換を表し、「/」については表記したいずれのアミノ酸を使用しても良いことを示している。

【0027】

二重置換体の例としては、Thr65Pro+Gly101Asn、Thr65Pro+Val273(Ile/Gly/Thr)、Gly101Asn+Thr359(Ser/Leu/Val/Ile/Gln)、Val273(Ile/Gly/Thr)+Tyr320(Phe/Val/Thr/Ile/Ile/Gly)等が挙げられるが、Thr65Pro+Ser387Ala、Thr359Ser+Ser387Alaが特に好ましい。

【0028】

三重変異体の例としては、Thr65Pro+Gly101Asn+Val273(Ile/Gly/Thr)、Tyr320(Phe/Val/Thr/Ile/Ile/Gly)+Val273(Ile/Gly/Thr)+Ser387(Ala/Lys/Gln/Glu/Arg/His)、Thr65Pro+Tyr320(Phe/Val/T

hr/Ieu/Ile/Gly)+Thr359(Ser/Leu/Val/Ile/Gln)等が挙げられるが、Thr65Pro+Gly101Asn+Ser387Ala、Thr65Pro+Val1273Ile+Tyr320Phe、Thr65Pro+Tyr320Phe+Ser387Ala等が好ましく、Thr65Pro+Val1273Ile+Thr359Ser、Thr65Pro+Val1273Ile+Ser387Ala、Thr65Pro+Tyr320Gly+Ser387Ala等が特に好ましい。

【0029】

四重変異体の例としては、Thr65Pro+Gly101Asn+Val1273(Ile/Gly/Thr)+Tyr320(Phe/Val/Thr/Icu/Ile/Gly)、Thr65Pro+Tyr320(Phe/Val/Thr/Ieu/Ile/Gly)+Thr359(Ser/Leu/Val/Ile/Gln)+Ser387(Ala/Lys/Gln/Glu/Arg/His)、Gly101Asn+Val1273(Ile/Gly/Thr)+Tyr320(Phe/Val/Thr/Ieu/Ile/Gly)+Ser387(Ala/Lys/Gln/Glu/Arg/His)等が挙げられるが、Thr65Pro+Val1273Ile+Thr359(Ser/Leu/Ile/Val/Thr)+Ser387(Glu/Ala)、Thr65Pro+Val1273Ile+Tyr320(Val/Leu/Phe/Thr)+Ser387(Ala/His/Gln)等が好ましく、Thr65Pro+Val1273Ile+Thr359Ser+Ser387(Ala/Lys)、Thr65Pro+Val1273Ile+Thr359Gln+Ser387Ala、Thr65Pro+Val1273Ile+Tyr320Phe+Ser387(Gln/Lys)、Thr65Pro+Val1273Ile+Tyr320Ile+Ser387Gln等が好ましい。

さらに五重、六重変異体の各組合せでも良い。

【0030】

本発明のアルカリプロテアーゼが変異体である場合、変異を施す前のアルカリプロテアーゼ(親アルカリプロテアーゼということがある)としては、「配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するプロテアーゼ」又は上述した「他種アルカリプロテアーゼ」として示したものが該当し、これに目的部位の変異を施すことにより本発明のアルカリプロテアーゼが得られる。例えばプロテアーゼKP43の配列番号1で示されるアミノ酸配列の前記(a)～(f)より選ばれる位置のアミノ酸残基又は他種アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列において当該位置に相当する位置のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換することにより得られる。

【0031】

本発明アルカリプロテアーゼは、例えば以下の方法により得ることができる。すなわち、クローニングされた親アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子に対して変異を施し、得られた変異遺伝子を用いて適当な宿主を形質転換し、当該組換え宿主を培養し、培養物から採取することにより得られる。親アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子のクローニングは、一般的な遺伝子組換え技術を用いればよく、例えばWO99/18218、WO98/56927記載の方法に従って行えばよい。

【0032】

親アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子の変異手段としては、一般的に行われているランダム変異や部異特異的変異の方法がいずれも採用できる。より具体的には、例えばSite-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Kmキット(Takara)等を用いて行うことができる。また、リコンビナントPCR(polymerase chain reaction)法(PCR protocols, Academic press, New York, 1990)を用いることによって、遺伝子の任意の配列を他の遺伝子の該任意の配列に相当する配列と置換することが可能である。

【0033】

得られた変異遺伝子を用いた本発明プロテアーゼの生産方法としては、例えば当該変異遺

伝子を安定に増幅できるDNAベクターに連結させ宿主菌を形質転換する、或いは当該変異遺伝子を安定に維持できる宿主菌の染色体DNA上に導入させる、等の方法が採用できる。この条件を満たす宿主としては例えばバチルス属細菌、大腸菌、カビ、酵母、放線菌等が挙げられ、これらの菌株を用い、資化性の炭素源、窒素源その他必須栄養素を含む培地に接種し、常法に従い培養すればよい。

【0034】

かくして得られた培養液中からのアルカリプロテアーゼの採取、及び精製は、一般の酵素の採取、及び精製方法に準じて行うことができる。例えば、培養液を遠心分離、又は濾過することで菌体を除き、培養上清液から常法の精製手段により目的酵素を得る。このようにして得られる酵素液は、そのまま用いることもできるが、更に公知の方法により精製、結晶化、粉末化、または顆粒化することもできる。

【0035】

得られたプロテアーゼは、酸化剤耐性を有し、高濃度の脂肪酸によるカゼイン分解活性の阻害を受けず、SDS-PAGEにより認められる分子量が43,000±2,000であり、アルカリ性域で活性を有すると共に、形質転換体での分泌能が高い。

ここで、「分泌能が高い」とは、例えば親アルカリプロテアーゼと同一の条件下において（例えばポリペプトンS8%（w/v）、酵母エキス0.3%、マルトース10%、硫酸マグネシウム7水和物0.04%、リン酸2水素カリウム0.2%、無水炭酸ナトリウム1.5%、テトラサイクリン30ppmから成る培地に植菌（v/v）し、30℃、3日間振とう培養する）、生産したアルカリプロテアーゼ変異体について培養上清中のプロテアーゼ活性量、タンパク質量を測定した場合、一定量以上の活性量又はタンパク質量を示すことをいい、例えば親アルカリプロテアーゼの5%以上、望ましくは10%以上、さらに望ましくは20%以上の活性量又はタンパク質量の増大が認められることを意味する。特に、比活性等の変化が認められなければ活性量とタンパク量の比は、親アルカリプロテアーゼと変異アルカリプロテアーゼでは一定の値をとると考えられることから、活性量又はタンパク質量のどちらか一方を測定しても構わない。

【0036】

従って、本発明のアルカリプロテアーゼは、各種洗剤組成物配合用酵素として有用である。

洗浄剤組成物中への本発明アルカリプロテアーゼの配合量は、当該プロテアーゼが活性を示す量であれば特に制限されないが、洗浄剤組成物1kg当たり0.1～5000PUが配合できるが、経済性等を考慮し、500PU以下が好ましい。

【0037】

本発明の洗浄剤組成物には、本発明のアルカリプロテアーゼ以外に様々な酵素を併用することもできる。例えば、加水分解酵素、酸化酵素、還元酵素、トランスフェラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、シンターゼ等である。このうち、本発明以外のプロテアーゼ、セルラーゼ、ケラチナーゼ、エステラーゼ、クチナーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、プルラーゼ、ペクチナーゼ、マンナーゼ、グルコシダーゼ、グルカナーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ等が好ましく、特にプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、リパーゼが好ましい。プロテアーゼとしては市販のアルカラールゼ（登録商標；ノボザイムズ社）、エスペラーゼ（登録商標；ノボザイムズ社）、サビナーゼ（登録商標；ノボザイムズ社）、エバラーゼ（登録商標；ノボザイムズ社）、カンナーゼ（登録商標；ノボザイムズ社）、プロペラーゼ（登録商標；ジェネンコア社）、ブラフェクト（登録商標；ジェネンコア社）、KAP（花王）等が挙げられる。セルラーゼとしてはセルザイム（登録商標；ノボザイムズ社）、ケアザイム（登録商標；ノボザイムズ社）、またKAC、特開平10-313859号公報記載のバチルス・エスピーKSM-S237株が生産するアルカリセルラーゼ、特願2002-116553号記載の変異アルカリセルラーゼ（以上、花王）等が挙げられる。アミラーゼとしてはターマミル（登録商標；ノボザイムズ社）、デュラミル（登録商標；ノボザイムズ社）、プラスター（登録商標；ジェネンコア社）、KAM（花王）等が挙げられる。リパーゼとしてはリポラー

ゼ（登録商標；ノボザイムズ社）、リポラーゼウルトラ（登録商標；ノボザイムズ社）等が挙げられる。

【0038】

洗浄剤組成物中で本発明のアルカリプロテアーゼ以外のプロテアーゼを併用する場合の配合量は、洗浄剤組成物1kg当たり0.1～500PUが好ましい。また、セルラーゼを併用する場合は、特開平10-313859号公報の段落〔0020〕に記載の酵素活性測定方法より決定される単位（U）に基づき、洗浄剤組成物1kg当たり300～3000000KUが好ましく、アミラーゼを併用する場合は、特開平11-43690号公報の段落〔0040〕に記載のアミラーゼ活性測定方法より決定される単位（IU）に基づき、洗浄剤組成物1kg当たり50～500000IUが好ましい。さらにリパーゼを併用する場合は、特表平8-500013号公報の実施例1記載のリパーゼ活性測定方法より決定される単位（LU）に基づき、洗浄剤組成物1kg当たり10000～1000000LUが好ましい。

10

【0039】

本発明の洗浄剤組成物には公知の洗浄剤成分を配合することができ、当該公知の洗浄剤成分としては、例えば次のものが挙げられる。

（1）界面活性剤

界面活性剤は洗浄剤組成物中0.5～60質量％配合され、特に粉末状洗浄剤組成物については10～45質量％、液体洗浄剤組成物については20～50質量％配合することが好ましい。また本発明洗浄剤組成物が漂白剤、または自動食器洗浄機用洗剤である場合、界面活性剤は一般に1～10質量％、好ましくは1～5質量％配合される。

20

本発明洗浄剤組成物に用いられる界面活性剤としては、陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤の1種または組み合わせを挙げることができるが、好ましくは陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤である。

陰イオン性界面活性剤としては、炭素数10～18のアルコールの硫酸エステル塩、炭素数8～20のアルコールのアルコキシ化物の硫酸エステル塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、パラフィンスルホン酸塩、 α -オレフィンスルホン酸塩、 α -スルホ脂肪酸塩、 α -スルホ脂肪酸アルキルエステル塩又は脂肪酸塩が好ましい。本発明では特に、アルキル鎖の炭素数が10～14の、より好ましくは12～14の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩が好ましく、対イオンとしては、アルカリ金属塩やアミン類が好ましく、特にナトリウム及び／又はカリウム、モノエタノールアミン、ジエタノールアミンが好ましい。

30

非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシアルキレンアルキル（炭素数8～20）エーテル、アルキルポリグリコシド、ポリオキシアルキレンアルキル（炭素数8～20）フェニルエーテル、ポリオキシアルキレンソルビタン脂肪酸（炭素数8～22）エステル、ポリオキシアルキレングリコール脂肪酸（炭素数8～22）エステル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックポリマーが好ましい。特に、非イオン性界面活性剤としては、炭素数10～18のアルコールにエチレンオキシドやプロピレンオキシド等のアルキレンオキシドを4～20モル付加した〔HLB値（グリフィン法で算出）が10.5～15.0、好ましくは11.0～14.5であるような〕ポリオキシアルキレンアルキルエーテルが好ましい。

40

【0040】

（2）二価金属イオン補捉剤

二価金属イオン補捉剤は0.01～50質量％、好ましくは5～40質量％配合される。本発明洗浄剤組成物に用いられる二価金属イオン補捉剤としては、トリポリリン酸塩、ピロリン酸塩、オルソリン酸塩等の縮合リン酸塩、ゼオライト等のアルミノケイ酸塩、合成層状結晶性ケイ酸塩、ニトリロ三酢酸塩、エチレンジアミン四酢酸塩、クエン酸塩、イソクエン酸塩、ポリアセタールカルボン酸塩等が挙げられる。このうち結晶性アルミノケイ酸塩（合成ゼオライト）が特に好ましく、A型、X型、P型ゼオライトのうち、A型が特に好ましい。合成ゼオライトは、平均一次粒径0.1～10 μ m、特に0.1～5 μ mのものが好適に使用される。

50

【0041】

(3) アルカリ剤

アルカリ剤は0.01～80質量%、好ましくは1～40質量%配合される。粉末洗剤の場合、デンス灰や軽灰と総称される炭酸ナトリウム等のアルカリ金属炭酸塩、並びにJIS 1号、2号、3号等の非晶質のアルカリ金属珪酸塩が挙げられる。これら無機性のアルカリ剤は洗剤乾燥時に、粒子の骨格形成において効果的であり、比較的硬く、流動性に優れた洗剤を得ることができる。これら以外のアルカリとしてはセスキ炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム等が挙げられ、またトリポリリン酸塩等のリン酸塩もアルカリ剤としての作用を有する。また、液体洗剤に使用されるアルカリ剤としては、上記アルカリ剤の他に水酸化ナトリウム、並びにモノ、ジ又はトリエタノールアミンを使用することができ、活性剤の対イオンとしても使用できる

10

【0042】

(4) 再汚染防止剤

再汚染防止剤は0.001～10質量%、好ましくは1～5質量%配合される。本発明洗剤組成物に用いられる再汚染防止剤としてはポリエチレングリコール、カルボン酸系ポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン等が挙げられる。このうちカルボン酸系ポリマーは再汚染防止能の他、金属イオンを捕捉する機能、固体粒子汚れを衣料から洗濯浴中へ分散させる作用がある。カルボン酸系ポリマーはアクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸等のホモポリマーないしコポリマーであり、コポリマーとしては上記モノマーとマレイン酸の共重合したものが好適であり、分子量が数千～10万のものが好ましい。上記カルボン酸系ポリマー以外に、ポリグリシジル酸塩等のポリマー、カルボキシメチルセルロース等のセルロース誘導体、並びにポリアスパラギン酸等のアミノカルボン酸系のポリマーも金属イオン捕捉剤、分散剤及び再汚染防止能を有するので好ましい。

20

【0043】

(5) 漂白剤

例えば過酸化水素、過炭酸塩等の漂白剤は1～10質量%配合するのが好ましい。漂白剤を使用するときは、テトラアセチルエチレンジアミン(TAED)や特開平6-316700号公報記載等の漂白活性化剤(アクチベーター)を0.01～10質量%配合することができる。

【0044】

(6) 蛍光剤

本発明洗剤組成物に用いられる蛍光剤としてはビフェニル型蛍光剤(例えばチノパールCBS-X等)やスチルベン型蛍光剤(例えばDM型蛍光染料等)が挙げられる。蛍光剤は0.001～2質量%配合するのが好ましい。

【0045】

(7) その他の成分

本発明品洗剤組成物には、衣料用洗剤の分野で公知のビルダー、柔軟化剤、還元剤(亜硫酸塩等)、抑泡剤(シリコーン等)、香料、その他の添加剤を含有させることができる。

【0046】

本発明の洗剤組成物は、上記方法で得られた本発明アルカリプロテアーゼ及び上記公知の洗剤成分を組み合わせることで常法に従い製造することができる。洗剤の形態は用途に応じて選択することができ、例えば液体、粉体、顆粒、ペースト、固形等にすることができる。かくして得られる本洗剤組成物は、衣料洗剤、漂白剤、硬質表面洗浄用洗剤、排水管用洗剤、義歯洗剤、医療器具用の殺菌洗剤等として使用することができる。

40

【0047】

【実施例】

[プロテアーゼ活性測定法-カゼイン法]

カゼイン1%(w/v)を含む50mMホウ酸緩衝液(pH10.5)1.0mLを30℃で5分間保温した後、0.1mLの酵素溶液を加え、15分間反応を行う。反応停止液

50

(0.11 M トリクロロ酢酸 - 0.22 M 酢酸ナトリウム - 0.33 M 酢酸) を 2.0 mL 加え、室温で 30 分間放置した後、濾過を行い、濾液中の酸可溶性タンパク質を Lowry らの方法の変法により定量した。すなわち、0.5 mL の濾液にアルカリ性銅溶液 (1% 酒石酸ナトリウム・カリウム : 1% 硫酸銅・5 水和物 : 2% 炭酸ナトリウム : 0.1 N 水酸化ナトリウム = 1 : 1 : 100) を 2.5 mL 加え、室温で 10 分間放置後、フェノール溶液 [フェノール試薬 (関東化学) を蒸留水にて 2 倍希釈したもの] を 0.25 mL 添加し、30℃で 30 分間保温した。その後、660 nm における吸光度を測定した。プロテアーゼ 1 単位 (1 PU) は、上記反応条件で 1 分間に 1 mmol のチロシンに相当する酸可溶性タンパク質分解物を遊離させるのに必要な酵素量とした。

【0048】

10

実施例 1

バチルス エスピー KSM-KP43 株由来のアルカリプロテアーゼ構造遺伝子の終止コドンまでを含む約 2.0 kb の範囲に対しランダム変異を与えた。ランダム変異導入法としては PCR 中の塩基の取り込みエラーを利用するために、DNA ポリメラーゼとしてエラー修復能が無い Taq ポリメラーゼ : Takara Taq (Takara) を用いた。まず、上記約 2.0 kb の DNA を増幅できるプライマー 1 (5' - AAAATGGATCCGTGAGGAGGGAACCGAATGAGAAAGAAAGAAAGAGGTG-3'、配列番号 2) 及びプライマー 2 (5' - ATATTCTAGACGATTACCA TATTAAATTCCTCTACCC-3'、配列番号 3) を用い PCR を行った。プライマー 1 はセンス鎖の 5' 末端側に BamHI リンカーを、プライマー 2 はアンチセンス鎖の 5' 末端側に XbaI リンカーを付与した。反応系として、鋳型 DNA 10 ng、各プライマーを 10 pmol、各 dNTP を 20 nmol、Takara Taq 添付反応バッファー 10 µL、及び Taq ポリメラーゼ 2.5 U を含有する 100 µL の系とした。PCR 条件は 94℃で 2 分間鋳型 DNA を変性させた後、94℃で 1 分間、55℃で 1 分間、72℃で 2 分間を 1 サイクルとし、これを 30 サイクル行った。PCR 産物を PCR product purification kit (ロッシュ) にて精製し、100 µL の滅菌水で溶出した。次に溶出液 1 µL を鋳型 DNA として、2 回目の PCR を行い、得られた PCR 産物を精製し、以後の実験に供した。

20

【0049】

増幅した約 2.0 kb の DNA 断片の末端制限酵素リンカーを、BamHI、XbaI (ロッシュ) により切断した。増幅 DNA を組み込むべき発現ベクターとしてはバチルス属細菌内で複製可能である pH A 64 (特願平 8-323050 : プロモーター 64 の下流に BamHI、XbaI サイトを有する) を用いた。BamHI、XbaI 処理した増幅 DNA 断片及び同じく BamHI、XbaI 処理した pH A 64 を混合した後、Ligation High (東洋紡) により、リガーゼ反応を行った。エタノール沈殿により、リガーゼ反応液から DNA を回収し、以後の形質転換用の DNA とした。

30

【0050】

形質転換すべき宿主としてバチルスエスピー KSM-KP43 (以後 KP-43 株と略す) を用いた。形質転換法はエレクトロポレーション法により行い、SSH-10 (島津製作所) 及びジーンパルサーキューベット (バイオラッド) を用い形質転換を行った。

40

【0051】

KP43 株の形質転換体をスキムミルク含有アルカリ寒天培地 [スキムミルク (ディフコ) 1% (w/v)、バクトトリプトン (ディフコ) 1%、酵母エキス (ディフコ) 0.5%、塩化ナトリウム 0.5%、寒天 1.5%、無水炭酸ナトリウム 0.05%、テトラサイクリン 15 ppm] に生育させ、ハローの形成状況により、プロテアーゼ遺伝子導入の有無を判定した。

プロテアーゼ遺伝子が pH A 64 に挿入されたプラスミドを保持している形質転換された KP43 株を選抜し、以後の培養に供した。

【0052】

各形質転換体について単集落分離、ハロー形成の確認を行い、試験管中の 5 mL 種母培地

50

【ポリペプトンS（日本製薬）6.0%（w/v）、酵母エキス0.1%、マルトース1.0%、硫酸マグネシウム7水和物0.02%、リン酸2水素カリウム0.1%、無水炭酸ナトリウム0.3%、テトラサイクリン30ppm】に植菌し、30℃、320rpmで一晩前培養した。この種母培養液を500mL容坂口フラスコ中の20mL主培地【ポリペプトンS8%（w/v）、酵母エキス0.3%、マルトース10%、硫酸マグネシウム7水和物0.04%、リン酸2水素カリウム0.2%、無水炭酸ナトリウム1.5%、テトラサイクリン30ppm】に1%植菌（v/v）し、30℃、121rpmで3日間培養した。得られた培養液を遠心分離し、培養上清中のプロテアーゼ活性を測定した。プロテアーゼ活性はカゼイン法により、タンパク質量はプロテインアッセイキット（和光純薬）を用いて測定した。野生型酵素遺伝子を有する形質転換体を同条件で培養した場合の培養上清の値と比較することにより、プロテアーゼ活性の向上が認められた変異プロテアーゼ遺伝子を選抜した。尚、培養上清中のタンパク質量はプロテアーゼ活性とほぼ比例して増加していることから、得られた変異体はタンパク質の分泌量が向上するのに必要な変異が導入されたことが、示唆された。

10

【0053】

選抜された形質転換体からHigh pure plasmid isolation kit（ロッシュ）を用いプラスミドを回収し、塩基配列を決定した。プラスミドDNA 300ngを鋳型として、プライマーとBig Dye DNA Sequencing kit（アプライドバイオシステム）を用いて20μLの反応系でPCRを行い、DNA Sequencer 377型（アプライドバイオシステム）を用いた解析に供した

20

【0054】

その結果、プロテアーゼ活性が向上した変異体は65位のスレオニンがプロリン、101位のグリシンがアスパラギン、273位のバリンがイソロイシン、320位のチロシンがフェニルアラニン、359位のスレオニンがセリン、387位のセリンがアラニンにそれぞれ置換されており、これにより約5%のプロテアーゼ活性の向上が認められた（表2）

【0055】

更に上記変異部位を組合わせることにより、プロテアーゼ活性の向上を検討した。部位特異的変異の手段としては、Site-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Kmキットを用い、以下のプライマーにより、変異部位の組み合わせを検討した。プライマー3：65位のスレオニン（T）をプロリン（P）に置換する（5'-AATGCCAATGATCCGAATGGTCAATG-3'、配列番号4）

30

プライマー4：101位のグリシン（G）をアスパラギン（N）に置換する（5'-TCATATCATGGATAGCAATGGGGGACTTGGAGG-3'、配列番号5）

プライマー5：273位のバリン（V）をイソロイシン（I）に置換する（5'-CTTCGTGAGCATTTTATCAAAAACAGAGGCATC-3'、配列番号6）

プライマー6：320位のチロシン（Y）をフェニルアラニン（F）に置換する（5'-AACGTTTGCCCTTTGTGAACGAGTCC-3'、配列番号7）

40

プライマー7：359位のスレオニン（T）をセリン（S）に置換する（5'-GCGAGCACATCTGCTTCCGTAACG-3'、配列番号8）

プライマー8：387位のセリン（S）をアラニン（A）に置換する（5'-TGACTTTACTGCGCCATACAAATGATAAC-3'、配列番号9）

【0056】

変異導入用鋳型プラスミドの作製は、カナマイシン選択用アンバー変異マーカートを有するpKF18kのマルチクロニングサイト中のBamHI、XbaIサイトに、前記スクリーニングで得られた変異プロテアーゼ遺伝子を導入することにより構築した。

【0057】

部位特異的変異導入用PCRにはTakara LA Taq（Takara）を用いた

50

。5'末端をリン酸化したセレクションプライマー (Mut an-Super Express Km キット添付) 及びプライマー3~8の各変異導入プライマーを各々5 pmol 及び鋳型プラスミド10 ngを用い変異導入PCRを行った。反応条件は94℃で2分間鋳型DNAを変性させた後、94℃で1分間、55℃で1分間、72℃で4分間を1サイクルとし、これを30サイクル行った。得られたPCR産物を用い大腸菌MV1184株を形質転換することにより、変異プラスミドを得た。得られた変異プラスミドは先述の塩基配列決定法に従い変異部位を確認した。

【0058】

部位特異的変異により変異導入されたプロテアーゼ遺伝子をpHA64に導入し、KP-43株を形質転換し、先述の条件で培養することで、野生型酵素に比べプロテアーゼ活性が更に増大する変異部位の組み合わせを検討した。

【0059】

その結果、T65P+S387A、T359S+S387A、T65P+V273I+Y320F、T65P+V273I+T359S、T65P+V273I+S387A、T65P+Y320F+S387A、T65P+G101N+S387A、T65P+V273I+T359S+S387Aの組み合わせにおいて10~30%のプロテアーゼ活性の向上が認められた(変異部位の組み合わせは+で示した。表1)。

【0060】

更に以下のプライマーを使用し、65位、101位、273位、320位、359位、387位のアミノ酸を任意のアミノ酸に置換し、それぞれの位置のアミノ酸が上記置換アミノ酸とは別のアミノ酸に置換が可能か否かを検討し、更にその組み合わせを検討した。

プライマー9: 65位のスレオニン(T)を任意のアミノ酸(X)に置換する(5'-CGAATAATGCCAATGATNNNAATGGTTCATGGTACGC-3'、配列番号10)

プライマー10: 101位のグリシン(G)を任意のアミノ酸(X)に置換する(5'-CTATCATGGATAGC N N N G G G G A C T T G G A G G - 3'、配列番号11)

プライマー11: 273位のバリン(V)を任意のアミノ酸(X)に置換する(5'-CGTGAGCATTTTNNNA AAAACAGAGGCATCACACC-3'、配列番号12)

プライマー12: 320位のチロシン(Y)を任意のアミノ酸(X)に置換する(5'-CCCTGAACGTTTGCCNNNGTGAAACGAGTCC-3'、配列番号13)

プライマー13: 359位のスレオニン(T)を任意のアミノ酸(X)に置換する(5'-CCCCCTGCGAGCACANNNGCTTCCGTAACGC-3'、配列番号14)

プライマー14: 387位のセリン(S)を任意のアミノ酸(X)に置換する(5'-GGAATAAGACTTTTACTNNNCCATACAATGATAAAGTGG-3'、配列番号15)

【0061】

その結果、273位のバリンはイソロイシン以外にグリシン、スレオニンへの置換、320位のチロシンはフェニルアラニン以外にバリン、スレオニン、ロイシン、イソロイシン、グリシンへの置換、359位のスレオニンはセリン以外にロイシン、バリン、イソロイシン、グルタミンへの置換、387位のセリンはアラニン以外にリジン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジンへの置換により、野生型と比べ酵素の分泌が向上していることが認められ、それぞれの位置で上記アミノ酸置換が可能であることが確認された。

【0062】

その組み合わせの一部の結果を示すと、T65P+Y320F+S387E、T65P+Y320G+S387A、T65P+V273I+T359S+S387E、T65P+V273I+T359L+S387A、T65P+V273I+T359I+S387A

、T65P+V273G+T359S+S387A、T65P+V273I+T359S+S387K、T65P+V273I+T359V+S387A、T65P+V273I+T359Q+S387A、T65P+V273I+Y320T+S387A、T65P+V273I+Y320F+S387E、T65P+V273I+Y320F+S387K、T65P+V273T+Y320F+S387A、T65P+V273I+Y320L+S387H、T65P+V273I+Y320V+S387Q、T65P+V273I+Y320I+S387Qの組み合わせにおいて10～30%のプロテアーゼ活性の向上が認められた(表2)。

【0063】

【表2】

	プロテアーゼ相対活性(%)
野生型	100
T65P	106
G101N	104
V273I	105
Y320F	105
T359S	106
S387A	106
T65P+S387A	107
T359S+S387A	109
T65P+G101N+S387A	114
T65P+V273I+Y320F	115
T65P+V273I+T359S	124
T65P+V273I+S387A	122
T65P+Y320F+S387A	123
T65P+Y320F+S387E	115
T65P+Y320G+S387A	122
T65P+V273I+T359S+S387A	130
T65P+V273I+T359S+S387E	111
T65P+V273I+T359L+S387A	109
T65P+V273I+T359I+S387A	117
T65P+V273G+T359S+S387A	113
T65P+V273I+T359S+S387K	129
T65P+V273I+T359V+S387A	118
T65P+V273I+T359Q+S387A	132
T65P+V273I+Y320T+S387A	121
T65P+V273I+Y320F+S387E	128
T65P+V273I+Y320F+S387K	127
T65P+V273T+Y320F+S387A	123
T65P+V273I+Y320L+S387H	113
T65P+V273I+Y320V+S387Q	120
T65P+V273I+Y320I+S387Q	130

【0064】

上記変異部位の組み合わせにより得られる、アルカリプロテアーゼは形質転換体での酵素の分泌を向上させる以外は親アルカリプロテアーゼの特性、すなわち、酸化剤耐性を有し、高濃度の脂肪酸によるカゼイン分解活性の阻害を受けず、SDS-PAGEにより認め

10

20

30

40

50

られる分子量が $43,000 \pm 2,000$ であり、アルカリ性域で活性を有する性質を保持していることを確認した。

実施例 2

(1) 洗剤の調製

攪拌翼を有した 1 m^3 の混合槽に水 465 kg を加え、水温が 55°C に達した後に 40% (w/v) ポリアクリル酸ナトリウム水溶液 135 kg を添加した。15 分間攪拌した後に、炭酸ナトリウム 120 kg 、硫酸ナトリウム 60 kg 、亜硫酸ナトリウム 9 kg 、蛍光染料 3 kg を添加した。更に 15 分間攪拌した後に、ゼオライト 300 kg を添加し、30 分間攪拌して均質なスラリーを得た (スラリー中の水分は 50 質量%)。このスラリーを噴霧乾燥塔の塔頂付近に設置した圧力噴霧ノズルから噴霧することでベース顆粒を得た (噴霧乾燥塔に供給する高温ガスは塔下部より温度が 225°C で供給し、塔頂より 105°C で排出)。次にレディゲミキサー (松阪技研 (株) 製、容量 20 L 、ジャケット付) に上記ベース顆粒 100 質量部を投入し、主軸 (150 rpm) の攪拌下、非イオン性界面活性剤 20 質量部、直鎖アルキル (炭素数 $10 \sim 13$) ベンゼンスルホン酸ナトリウム 22 質量部、脂肪酸 (炭素数 $14 \sim 18$) ナトリウム 4 質量部、ポリエチレングリコール 2 質量部、水 4 質量部の混合液を 3 分間で投入し、その後 5 分間攪拌を行った。更にこのミキサーに結晶性ケイ酸ナトリウム 20 質量部とゼオライト 10 質量部を投入し、表面被覆を行い洗剤ベースを得た。

洗剤ベース 99 質量% に本発明プロテアーゼ粒子 0.5 質量%、及び香料 0.5 質量% を混合して最終粒状洗剤 A を得た。

【0065】

(2) 使用した原料

非イオン性界面活性剤：エチレンオキサイド平均付加モル数が 8.5 のエマルゲン 108 KM (花王 (株) 製)

ポリアクリル酸ナトリウム水溶液：平均分子量 10000 (特公平 $2-24283$ 号公報の実施例に記載の方法に従って製造した)

炭酸ナトリウム：デンス灰 (セントラル硝子 (株) 製)

ゼオライト：平均粒径が $3.5\text{ }\mu\text{m}$ のゼオライト 4 A 型 (東ソー (株) 製)

ポリエチレングリコール：K-PEG 6000 (平均分子量 8500 ，花王 (株) 製)

結晶性ケイ酸ナトリウム：粉末 $\text{SKS}-6$ (ヘキストクヤマ (株) 製)

本発明プロテアーゼ粒子：表 2 記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭 $62-257990$ 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6 PU/g)

蛍光染料：チノパール CBS-X (チバガイギー社製)

【0066】

実施例 3

(1) 洗剤の調製

まず固形分 50 質量% のスラリーを熱風温度 250°C で噴霧乾燥し、ポリアクリル酸ナトリウム (質量平均分子量 10000) 7 質量%、炭酸ナトリウム 26 質量%、硫酸ナトリウム 20 質量%、塩化ナトリウム 6 質量%、蛍光染料 0.5 質量%、ゼオライト 40 質量%、水 0.5 質量% のベース顆粒を得た。

次にレディゲミキサー (松阪技研 (株) 製、容量 20 L 、ジャケット付) に上記ベース顆粒 100 質量部を投入し、主軸 (150 rpm) の攪拌下、非イオン性界面活性剤 20 質量部、直鎖アルキル (炭素数 $10 \sim 13$) ベンゼンスルホン酸ナトリウム 22 質量部、脂肪酸 (炭素数 $14 \sim 18$) ナトリウム 4 質量部、ポリエチレングリコール 2 質量部、水 4 質量部の混合液を 3 分間で投入し、その後 5 分間攪拌を行った。更にこのミキサーに結晶性ケイ酸ナトリウム 20 質量部とゼオライト 10 質量部を投入し、表面被覆を行い洗剤ベースを得た。

洗剤ベース 95 質量% に漂白剤粒子 2.8 質量%、漂白活性剤粒子 1.2 質量%、本発明プロテアーゼ粒子 0.5 質量%、及び香料 0.5 質量% を混合して最終粒状洗剤 B を得た

【0067】

(2) 使用した原料

非イオン性界面活性剤：エチレンオキサイド平均付加モル数が8.5のエマルゲン108 KM（花王（株）製）

ポリアクリル酸ナトリウム水溶液：平均分子量10000（特公平2-24283号公報の実施例に記載の方法に従って製造した）

炭酸ナトリウム：デンス灰（セントラル硝子（株）製）

ゼオライト：平均粒径が3.5 μ mのゼオライト4A型（東ソー（株）製）

ポリエチレングリコール：K-PEG6000（平均分子量8500，花王（株）製）

結晶性ケイ酸ナトリウム：SKS-6（ヘキストクヤマ（株）製）

本発明プロテアーゼ粒子：表2記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭62-257990号公報の実施例1に記載の方法に基づき調製した造粒物（6PU/g）

蛍光染料：チノパールCBS-X（チバガイギー社製）

漂白剤粒子：炭酸ナトリウム・過酸化水素付加物（特開2000-256699号公報の段落〔0019〕記載の漂白剤粒子と同様にして得た）

漂白活性剤粒子：ラウロイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウムの造粒物（特開2000-256699号公報の段落〔0018〕記載の漂白活性剤粒子と同様にして得た）

【0068】

実施例4

表3に示す液体洗浄剤組成物（洗剤C、及び洗剤D）を調製した。

【0069】

【表3】

成分	洗剤C（質量%）	洗剤D（質量%）
非イオン性界面活性剤 ¹⁾	25.0	—
非イオン性界面活性剤 ²⁾	5.0	—
非イオン性界面活性剤 ³⁾	10.0	—
非イオン性界面活性剤 ⁴⁾	—	9.0
非イオン性界面活性剤 ⁵⁾	—	9.0
非イオン性界面活性剤 ⁶⁾	—	2.5
陰イオン性界面活性剤 ⁷⁾	1.0	—
シリコーン ⁸⁾	—	0.8
カルボン酸系ポリマー ⁹⁾	2.0	—
ポリマー ¹⁰⁾	—	0.8
クエン酸	0.2	—
塩化カルシウム	0.05	—
モノエタノールアミン	4.0	—
トリエチレングリコールフェニルエーテル	3.0	—
プロピレングリコール	3.0	—
エタノール	2.0	2.0
亜硫酸ナトリウム	0.2	—
本発明プロテアーゼ ¹¹⁾	0.5	1.0
香料	0.5	0.5
水	残部	残部
合計	100	100
使用濃度	20g/30L	40g/30L
洗浄液のpH	10.5	7.3

【0070】

1) 炭素数12～14の2級アルコール由来のアルキル基を有するポリオキシエチレン（平均7モル付加）アルキルエーテル（ソフタノール70、日本触媒化学工業製）

- 2) 炭素数12～14の2級アルコール由来のアルキル基を有するポリオキシエチレン (平均12モル付加) アルキルエーテル (ソフタノール120、日本触媒化学工業製)
- 3) 炭素数10～14の直鎖第1級アルコールにEOを平均5モル、POを平均2モル、EOを平均3モルの順にブロック付加させたもの
- 4) ポリオキシエチレンラウリルエーテル、EOを平均8モル付加させたもの 5) ポリオキシエチレンラウリルエーテル、EOを平均11.5モル付加させたもの
- 6) ナローレンジポリオキシエチレンアルキル (sec-C₁₂/C₁₃) エーテル
- 7) 炭素数10～14の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム
- 8) アミド/エーテル変性シリコーンポリマー (東レ・ダウコーニングシリコーン (株) 製、BY16-906)
- 9) 特開平10-60476号公報の11頁6行～13行記載の方法で合成したフェノキシポリエチレングリコール、アクリル酸、マレイン酸共重合体 (質量平均分子量10000、固形分51.2%)
- 10) ペンテン/マレイン酸 (50/50モル比) コポリマーのナトリウム塩 (質量平均分子量7000)
- 11) 表2記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品 (15PU/g)

【0071】

実施例5

下記の表4に示す組成のうち、過炭酸ナトリウムと炭酸ナトリウム (デンス灰) を攪拌混合しながら、ポリアクリル酸ナトリウム40%水溶液、及び直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、又は非イオン性界面活性剤、又はラウロイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウムを添加した。次いで特開昭62-257990号公報の実施例1に記載の方法に基づき調製した本発明プロテアーゼ粒子を添加し、全体的に均一になる程度攪拌することにより、漂白剤を調製した。

【0072】

【表4】

成分	漂白剤E (質量%)	漂白剤F (質量%)
過炭酸ナトリウム ¹⁾	72.0	72.0
炭酸ナトリウム (デンス灰)	20.0	20.0
陰イオン性界面活性剤 ²⁾	2.0	—
非イオン性界面活性剤 ³⁾	—	2.0
ポリアクリル酸ナトリウム ⁴⁾	1.0	1.0
ラウロイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム	4.0	4.0
本発明プロテアーゼ ⁵⁾	1.0	1.0

【0073】

- 1) 粒径500～700μm
- 2) 炭素数12～14の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム
- 3) ポリオキシエチレンアルキルエーテル (アルキル基の炭素数12～14、EO平均付加モル数12)
- 4) 平均分子量8,000
- 5) 表2記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭62-257990号公報の実施例1に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6PU/g)

【0074】

実施例6

下記の表5に示す全自動食器洗浄機用洗浄剤組成物 (洗剤G、及びH) を調製した。

【0075】

【表5】

成分	洗剤G (質量%)	洗剤H (質量%)
ブルロニックL-61 ¹⁾	—	4.0
ソフタノールEP-7085 ²⁾	4.0	—
クエン酸3ナトリウム	—	30.0
トリポリリン酸ナトリウム	30.0	—
過炭酸ナトリウム	20.0	20.0
炭酸ナトリウム	20.0	20.0
非晶質珪酸塩 ³⁾	10.0	10.0
AA-MA ⁴⁾	4.0	4.0
硫酸ナトリウム	10.0	10.0
α -アミラーゼ ⁵⁾	1.0	1.0
本発明プロテアーゼ ⁶⁾	1.0	1.0

10

【0076】

- 1) ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体 (平均分子量2,000)
- 2) 炭素数12~14のsec-アルコールのエチレンオキサイド7モル、及びプロピレンオキサイド8.5モル付加物
- 3) JIS 2号珪酸ナトリウム
- 4) アクリル酸-マレイン酸共重合体
- 5) デュラミル60T (TM) (ノボザイムズ社製)
- 6) 表2記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭62-257990号公報の実施例1に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6PU/g)

20

【0077】

実施例7

下記の表6に示す各成分を用い、硬質表面用洗浄剤組成物 (洗剤J) を得た。

【0078】

【表6】

成分	洗剤J (質量%)
陰イオン性界面活性剤 ¹⁾	15.0
非イオン性界面活性剤 ²⁾	5.0
非イオン性界面活性剤 ³⁾	5.0
両性界面活性剤 ⁴⁾	7.5
両性界面活性剤 ⁵⁾	4.0
クエン酸	1.0
ポリプロピレングリコール ⁶⁾	2.0
エタノール	5.0
本発明プロテアーゼ ⁷⁾	1.0
香料、水、その他/pH調整剤	54.5
合計	100.0

30

【0079】

- 1) ポリオキシエチレン (EOP=4) アルキル (C12) エーテル硫酸エステルナトリウム
- 2) ポリオキシエチレン (EOP=8) アルキル (C12) エーテル
- 3) アルキル (C12) ポリグルコシド (縮合度1.3)
- 4) モノ長鎖第3級アルキル (C12) ジメチルアミノオキシド
- 5) アルキル (C12) ヒドロキシジメチルスルホベタイン
- 6) 分子量10000
- 7) 表2記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品 (15PU/mL)

【0080】

40

50

実施例 8

前記洗剤 A (実施例 2 参照) を用いて下記表 7 記載の粒状洗剤を得た。

【 0 0 8 1 】

【 表 7 】

成分 (質量%)	洗剤K	洗剤L	洗剤M	洗剤N
実施例 2 の洗剤ベース	98.4	98.3	98.5	97.2
香料	0.5	0.5	0.5	0.5
本発明プロテアーゼ ¹⁾	0.5	0.5	0.5	0.5
従来プロテアーゼ ²⁾	0.6			0.6
セルラーゼ ³⁾		0.7		0.7
リパーゼ ⁴⁾			0.5	0.5

10

【 0 0 8 2 】

1) 表 2 記載の本発明アルカリプロテアーゼの各精製標品から特開昭 6 2 - 2 5 7 9 9 0 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6 P U / g)

2) 特開平 5 - 2 5 4 9 2 号公報に記載のプロテアーゼ K - 1 6 を特開昭 6 2 - 2 5 7 9 9 0 号公報の実施例 1 に記載の方法に基づき、5 P U / g としたもの

3) K A C - 5 0 0 (花王 (株) 製)

4) リポラーゼ 1 0 0 T (TM) (ノボザイムズ社製)

20

【 0 0 8 3 】

【 発明の 効果 】

本発明によれば、高濃度の脂肪酸存在下でも活性を有し、蛋白質だけでなく皮脂等の混在する複合汚れに対しても優れた洗浄性を有すると共に、分泌能の高いアルカリプロテアーゼを提供できる。

【 0 0 8 4 】

【 配列表 】

SEQUENCE LISTING

<110> KAO CORPORATION

<120> Alkaline protease

<130> P04721410

<150> JP P2002-081428

<151> 2002-03-22

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 1

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser

1

5

10

15

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly

20

25

30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35

40

45

10

20

30

40

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp
50 55 60

Thr Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly
65 70 75 80

Ser Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser
85 90 95

Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln
 100 105 110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn
 115 120 125

Ser Trp Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn
 130 135 140

10

Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala
 145 150 155 160

Gly Asn Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala
 165 170 175

20

Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe
 180 185 190

Gly Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg
 195 200 205

30

Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly
 210 215 220

Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe
 225 230 235 240

Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met
 245 250

40

Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe
 260 265 270

Val Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala
 275 280 285

Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn
 290 295 300

Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr
 305 310 315 320

Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser
 325 330 335

Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser
 340 345 350

Asp Ala Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu
 355 360 365

Asp Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp
 370 375 380

Phe Thr Ser Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu
 385 390 395 400

10

20

30

40

Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val

405

410

415

Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile

420

425

430

Val Asn

10

<210> 2

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

20

aaatggatcc gtgaggaggg aaccgaatga gaaagaagaa aaaggtg 47

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<400> 3

atattctaga cgattaccat attaatcct ctaccc 36

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<400> 4

aatgccaatg atccgaatgg tcatg 25

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<400> 5

tctatcatgg atagcaatgg gggacttgga gg 32

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<400> 6

cttcgtgagc attttatcaa aaacagaggc atc 33

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<400> 7

aacgttgcct ttgtgaacga gtcc 24

<210> 8

<211> 24

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

gcgagcacaat ctgcttccgt aacg 24

<210> 9

10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

tgactitact gcgccataca atgataac 28

20

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

cgaataatgc caatgatnnn aatggatcgt gtacgc 36

30

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

40

ctatcatgga tagcnnnggg ggacttggag g 31

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

cgtagagcatt tinnnaaaaa cagaggcatc acacc 35

10

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

ccctgaacgt tgccnnngtg aacgagtc 29

20

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

cccctgcgag cacannngct tccgtaacgc 30

30

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

ggaaatgact ttactnnncc atacaatgat aactgg 36

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアルカリプロテアーゼのアミノ酸配列を整列させた図である。

[illegible]

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/54	
C 1 2 N 9/54	C 1 2 N 5/00	A
/(C 1 2 N 9/54	C 1 2 N 9/54	
C 1 2 R 1:07)	C 1 2 R 1:07	

(72)発明者 佐伯 勝久
 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 野村 昌史
 和歌山県和歌山市湊 1 3 3 4 花王株式会社研究所内

(72)発明者 小林 徹
 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

F ターム (参考) 4B024 AA03 BA14 CA02 DA07 EA04 GA14 HA01
 4B050 CC04 DD02 LL04
 4B065 AA15X AA15Y AB01 BA02 BA03 CA33 CA57
 4H003 AB03 AB19 AC08 AC09 DA01 EA12 EA15 EA16 EA28 EB22
 EB30 EB32 EB36 EB37 EC02 ED02 FA09 FA47